

ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 615.281:547.99

А. С. Критченков^{1,2}, О. В. Волкова², Н. В. Железняк³, О. В. Курлюк³, Т. В. Шаколо³,
А. П. Дысин², Н. А. Липкан²

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИАЗОЛБЕТАИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА

¹Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург,
Российская Федерация

²Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики, г. Санкт-Петербург,
Российская Федерация

³Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь

Цель настоящего исследования состояла в оценке антибактериальной активности in vitro и in vivo и токсичности in vitro катионных триазолбетаиновых производных хитозана по сравнению с исходным хитозаном, ампициллином, гентамицином и триазолбетаином. Показано, что триазолбетаиновые производные хитозана обладают выраженной антимикробной активностью in vitro в отношении S. aureus и E. coli, превышающей активность исходного хитозана. Наибольшая активность характерна для высокозамещенных производных, и она превышает антимикробную эффективность антибиотиков ампициллина и гентамицина. Высокозамещенные триазолбетаиновые производные обладают высокой антибактериальной активностью in vivo, превышающей активность антибиотиков ампициллина и гентамицина. Токсичность изученных производных крайне низка либо не проявляется вовсе. Таким образом, введение в хитозановую цепь триазолбетаина значительно повышает антибактериальную активность хитозана и значительно снижает токсичность триазолбетаина.

Ключевые слова: полисахариды, антибактериальная активность, катионные производные, взаимосвязь «структура-активность».

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших задач современной фармакологии является поиск новых высокоэффективных и биологически безвредных органических соединений, обладающих антибактериальной активностью. Предпосылкой для данного вида исследований послужило наличие значительного роста резистентных к классическим антибиотикам штаммов микроорганизмов [1]. Одним из направлений поиска таких соединений и расширения номенклатуры современных субстанций для фармацевтического использования является получение и исследование антибактериальных свойств поликатионов – полиме-

ров различного происхождения, несущих положительно заряженные фрагменты и обладающих широким спектром антимикробного действия. В этом плане особый научно-практический интерес представляет хитозан. Это природный полиаминосахарид, представляющий сополимер глюкозамина и ацетилглюкозамина, который обладает рядом ценных свойств, таких как биологическая безвредность, биосовместимость, гипоаллергенность, биodeградируемость. Все перечисленные факторы обеспечивают возможность использования данной субстанции в практической медицине и биотехнологии для получения на его основе многочисленных производных [2].

Последние исследования показывают, что катионные производные хитозана обладают большей антибактериальной активностью, чем исходный хитозан. Кроме того, в отличие от хитозана, его катионные производные, как правило, хорошо растворимы в воде. Однако введение в полимерную матрицу хитозана катионного фрагмента, обеспечивающего антибактериальный эффект, зачастую увеличивает токсичность полимера [2].

Бетаин ($(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$) является природным метаболитом, имеющим катионный четвертичный аммониевый фрагмент. Бетаин характеризуется биосовместимостью, биodeградируемостью и крайне низкой токсичностью. Гидрофильность бетаина обуславливает хорошую растворимость в воде самого бетаина и его производных [3].

Целью данного исследования явилось изучение антибактериальной активности *in vitro* и *in vivo* производных хитозана, содержащих бетаиновый фрагмент с выявлением взаимосвязей «структура-активность».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящем исследовании использовали низкомолекулярный крабовый хитозан (ЗАО «Биопрогресс», Россия) со средней молекулярной массой $6,9 \times 10^4$, степенью ацетилирования 0,22, влажностью 8,9 %; хлоруксусный альдегид (Aldrich, США); эпихлоргидрин (Aldrich, США); натрия боргидрид (Aldrich, США); пропаргиловый эфир бетаина хлорида (Aldrich, США); меди (II) сульфат кристаллогидрат пятиводный (Aldrich, США); натрия аскорбат (Aldrich, США).

Спектры ЯМР¹H регистрировали на приборе BrukerAvance (Bruker, Германия) П+ 400 MHz в растворе D₂O/CF₃COOH 100/1 при 70 °С. Степень замещения производных определяли по данным спектроскопии ЯМР¹H.

Синтез азидных производных хитозана **a** осуществляли по методике [4].

Синтез азидных производных хитозана **a'**

Хитозан (0,05 г) растворяли в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной (15 мл). К полученному раствору добавляли 3, 7 или 9 эквивалентов 1-азидо-3-хлорпропан-2-ола. Реакционную смесь ин-

тенсивно перемешивали в течение 6 часов при комнатной температуре с использованием магнитной мешалки ММ-02. Полученные полимеры осаждали ацетоном, промывали ацетоном, метанолом, сушили на воздухе при комнатной температуре.

Синтез триазолбетаиновых производных хитозана 1–3 и 1'–3'

К суспензии азидного производного хитозана **a** или **a'** (0,05 г) в 7 мл воды добавляли 0,1 эквивалента меди (II) сульфата кристаллогидрата пятиводного, 0,2 эквивалента натрия аскорбата и 1,1 эквивалента пропаргилового эфира бетаина хлорида **b**, перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. Полученную смесь диализовали против воды, сушили лиофильно.

Определение антибактериальной активности в опытах *in vitro*

Антибактериальную активность триметиламинобензильных производных хитозана изучали методом «диффузии в агар» в отношении штаммов *S. aureus* RCMB 010027 и *E. coli* RCMB 010051 (VSMU) в соответствии с методикой Государственной фармакопеи Российской Федерации, 14-го издания [5]. В стеклянные чашки Петри размером 20,0 × 100,0 мм разливали питательную среду. Стерильные цилиндры высотой 10,0 мм и внутренним диаметром 6,0 мм размещали на засеянную микроорганизмами среду по 6 штук в каждую чашку Петри. В цилиндры помещали растворы исследуемых образцов. Для сравнения в случае *S. aureus* использовали ампициллин (Aldrich), а для *E. coli* – гентамицин (Aldrich) как коммерчески доступные лекарственные средства (ЛС), обладающие антибактериальным действием. Антибактериальную активность исследуемых образцов определяли путем измерения диаметра зоны подавления роста микроорганизмов (в мм) после культивирования в термостате при температуре 37 °С в течение одних суток. Диаметры зон подавления роста изучали с точностью до 0,1 мм с использованием штангенциркуля [5].

Исследование токсичности с помощью МТТ-теста

Готовили серийные разведения исследуемых соединений в питательной среде alpha-MEM. Растворы объемом 0,1 мл добавляли к конфлюэнтному монослою клеток НЕК-293, культивируемому в луночном планшете. Клетки инкубировали

при температуре 37 °С в атмосфере с содержанием 5 % углекислого газа 24 часа. Затем клетки дважды промывали фосфатным буферным раствором и добавляли 0,1 мл раствора 3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолий бромида в фосфатном буферном растворе (0,5 мкг/мл), инкубировали 1 час. Далее супернатант заменяли на 0,1 мл спирта этилового с концентрацией 96 % и измеряли оптическую плотность при длине волны 535 нм.

Определение антибактериальной активности в опытах *in vivo*

Для исследования использовали 18 самцов белых крыс возраста 3 месяцев массой 180–200 г. В виварии для подопытных животных были созданы стандартные условия: контролируемая температура (22 ± 2 °С), влажность воздуха 65 ± 10 %, режим освещения при свободном доступе к воде и стандартному корму (гранулированный комбикорм). Эксперименты проводили в первой половине дня (10:00–13:00 по местному времени) с соблюдением правил по гуманному обращению с лабораторными животными. В работе выдержаны все общие требования «Правил надлежащей лабораторной практики» [6] и Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях [7]. Белым крысам-самцам выбривали среднюю треть правой

половины брюшной стенки, кожу обрабатывали спиртовым раствором йода, в качестве инфекционного агента применяли микробную смесь, в брюшную полость в физиологическом растворе инъекционно вводили 3 мл полимикробной суспензии, состоящей из одинакового количества штаммов *S. aureus* и *E. coli*. Через 24 часа после заражения в контрольных группах стерильным шприцем проводили сбор экссудата по 200 мкл. В экспериментальных группах крысам через сутки вводили раствор 3'производного, хитозана гидрохлорида, ампициллина, гентамицина либо триазолбетаина. Через 7 часов после введения забирали по 200 мкл экссудата. Каждую полученную пробу экссудата разводили физиологическим раствором, готовили 6 десятикратных разведений и равномерно наносили по 100 мкл на чашку Петри с мясопептонным агаром. Посевы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 24 часов и проводили подсчет колоний. Далее делали перерасчет колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 мл экссудата [8, 9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез триазолбетаиновых производных хитозана осуществляли с использованием методологии клик-химии азид-алкинового циклоприсоединения (рисунок 1) [10].

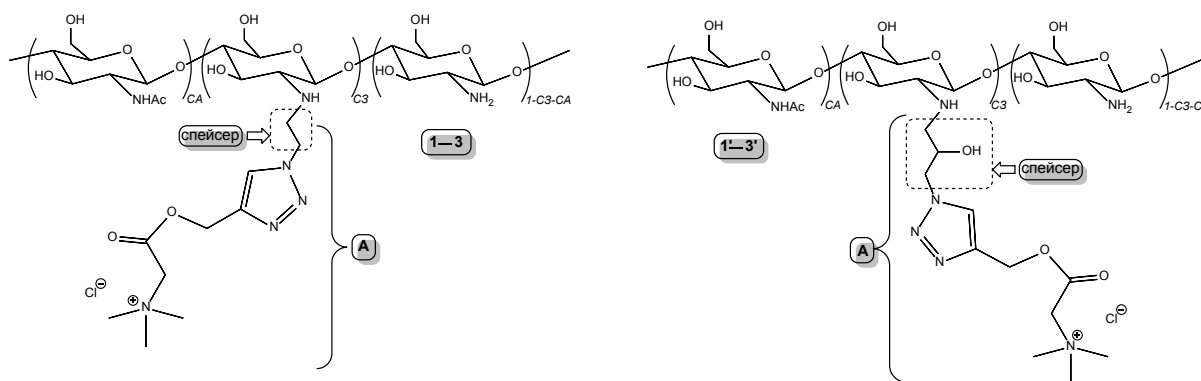


Рисунок 1. – Структура производных 1–3 и 1'–3'

В результате для дальнейших исследований были получены два структурно-химических типа триазолбетаиновых производных хитозана, различающихся спейсерами. Внутри каждого из структурно-химических типов производные отличались

степенями замещения. Степень замещения соответствует числу звеньев, несущих катионный фрагмент А в макромолекуле.

Таким образом, в исследовании использовали производные низкомолекулярно крабового хитозана с коротким (1–3)

и длинным (1'–3') спейсерами с низкой – 0,14 (1) и 0,16 (1'), умеренной – 0,43 (2) и 0,45 (2') и высокой – 0,64 (3) и 0,6 (3') степенями замещения.

Антибактериальную активность полученных производных изучали с помощью метода «диффузии в агар». Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Антибактериальная активность *in vitro* производных хитозана 1–3 и 1'–3'

Образец	Микроорганизм	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
	Зона задержки роста микроорганизмов, мм	
Хитозан	13,3 ± 0,4	10,4 ± 0,6
Триазол	11,5 ± 0,0	7,2 ± 0,0
Триазолобетаин	33,3 ± 1,3	14,9 ± 0,0
Производное 1	21,3 ± 0,2	12,3 ± 0,2
Производное 1'	24,3 ± 0,1	15,5 ± 0,2
Производное 2	27,9 ± 0,1	18,8 ± 0,1
Производное 2'	32,1 ± 0,1	20,1 ± 0,1
Производное 3	36,5 ± 0,1	28,2 ± 0,1
Производное 3'	41,3 ± 0,1	34,2 ± 0,1
Ампициллин	30,2 ± 0,1	–
Гентамицин	–	22,1 ± 0,2

Триазольные бетаиновые производные обладают антибактериальной активностью, значительно превышающей антибактериальный эффект хитозана. Антимикробная активность триазольных бетаиновых производных хитозана имела выраженную зависимость от степени замещения. Так, например, диаметр зоны задержки роста микроорганизмов грамположительной бактерии *S. aureus*, вызванной низкозамещенным производным 1', составил 24,3 ± 0,1 мм. В то же время высокозамещенное производное 3', относящееся к такому же структурно-химическому типу триазольных бетаиновых производных, оказывало антибактериальный эффект в отношении *S. aureus* в 1,7 раза превосходящий таковой для производного 1'. Такая же тенденция наблюдается и в отношении грамотрицательного микроорганизма *E. coli*. Данный эффект, скорее всего, связан с увеличением эффективного положительного заряда в макромолекуле производного хитозана, т.е. катионной плотности. Катионная плотность позволяет макромолекуле производного эффективно взаимодействовать с отрицательно заряженными сайтами на поверхности бактериальной клетки. Увеличение катионной плотности макромолекулы способствует улучшению данного электростатического взаимодействия и, как следствие, росту антибактериальной активности производного. Тенденция к росту антибактериального

эффекта с увеличением степени замещения в равной степени проявлялась у обоих структурно-типов триазольных бетаиновых производных. Следовательно, рост антибактериальной активности, вызванный увеличением катионной плотности, имеет зависимость только от степени замещения и не зависит от спейсера.

Тем не менее, антибактериальный эффект триазольных бетаиновых производных в целом характеризуется отчетливой зависимостью от химической структуры спейсера. Во всех случаях наиболее выраженным антибактериальным действиям обладают производные со спейсером – $\text{CH}_2\text{--CH(OH)--CH}_2\text{--}$ в сравнении с производными, имеющими спейсер – $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--}$. Так, например, зона ингибирования, вызванная производным 1', составила 24,3 ± 0,1 мм, в то время как зона задержки роста микроорганизмов производным 1 составила 21,3 ± 0,2 мм.

Для дальнейшего выяснения связи «структура–активность» изучали антибактериальный эффект веществ с введенными в хитозановую матрицу фрагментами. Антибактериальная активность у самого бетаина отсутствует. Таким образом, сам по себе бетаин не является фармакофором, обеспечивающим антибактериальную активность производных.

Триазольная гетероциклическая система, вероятно, вносит вклад в антибактериальную активность хитозановых про-

изводных. Антибактериальный эффект триазола сопоставим с антибактериальной активностью исходного хитозана.

Триазолбетаин проявляет высокую антибактериальную активность в отношении грамположительной бактерии *S. aureus*, причём эффективность триазолбетаина несколько выше активности антибиотика ампициллина. В то же время эффект триазолбетаина в отношении грамотрицательной бактерии *E. coli* в 1,5 раза ниже активности антибиотика гентамицина. Однако введение триазолбетаинового фрагмента в хитозановую цепь резко меняет ситуацию. Особенно отчетливо эти изменения проявляются у высокозамещенного производного **3'**. Данное производное обладает очень высокой антибактериальной активностью в отношении *S. aureus* и *E. coli*, превышающей как активность триазолбетаина, так и активность антибиотиков ампициллина и гентамицина. Данный эффект может быть объяснен структурно-химическими особенностями полученных катионных производных хитозана. С одной стороны, важный вклад в антибактериальную активность производных вносит катионная плотность, обусловленная наличием катионного триазолбетаинового фрагмента, который сам по себе обладает антибактериальной активностью. С другой стороны, наличие триазолбетаинового фрагмента усиливает хелатирующие способности производного, что особенно важно в случае грамотрицательных бактерий. Ярко выраженные хелатирующие свойства триазолбетаиновых производных обуславливают захват двухзарядных катионов металлов, которые за счет электростатических взаимодействий обеспечивают устойчивость слоя липополисахарида (ЛПС). При удалении этих катионов триазолбетаиновыми производными хитозана из внешней мембраны бактерий происходит дестабилизация мембраны посредством освобождения молекул ЛПС [11].

Результаты исследования показали, что производное **3'** в сравнении с ампициллином и гентамицином характеризуется высокой антибактериальной активностью в отношении *S. aureus* и *E. coli*. Связь «структура–активность» также выявляется и при рассмотрении результатов исследования токсичности полученных производных с помощью МТТ-теста. Дан-

ный тест был использован для сравнения токсичности триазолбетаина и наиболее активного высокозамещенного триазолбетаинового производного хитозана. МТТ-тест представляет собой колориметрический метод оценки количества жизнеспособных клеток в культуре. Данный тест основан на том, что НАДФН-зависимые дегидрогеназы живых клеток восстанавливают 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид (МТТ) в формазан, окрашенный в пурпурный цвет. Интенсивность окраски пропорциональна жизнеспособности культуры. В ходе исследования проведено сравнение токсических свойств исходного хитозана гидрохлорида, ампициллина, гентамицина и триазолбетаина с триазолбетаиновым производным **3'**. Результаты эксперимента представлены на гистограмме (рисунок 2).

В результате экспериментов установлено, что триазолбетаин характеризуется токсичностью, превышающей токсичность исходного хитозана и его производного **3'**. Производное **3'** характеризуется низкой токсичностью. Так, например, при концентрациях не более 1000 мкг/мл токсичность соединения **3'** в пределах погрешности не отличается от токсичности исходного хитозана. При дальнейшем росте концентрации высокозамещенное производное **3'** показывает несколько более выраженную токсичность, нежели исходный хитозан. Таким образом, негативное влияние, вызванное токсичностью триазолбетаинового заместителя, не проявляется. Следовательно, конъюгация триазолбетаина с хитозановой матрицей усиливает антибактериальный эффект триазолбетаина, при этом значительно снижая его токсичность.

С целью дальнейшей проверки эффективности полученного высокоактивного и малотоксичного производного **3'** проводили испытания данного полимера *in vivo* на крысах в сравнении с хитозаном гидрохлоридом, ампициллином, гентамицином, а также триазолбетаином (таблица 2).

Наименьшая антибактериальная активность *in vivo* наблюдалась у исходного хитозана. Значение КОЕ на 1 мл экссудата в данном случае лишь в 1,4 раза меньше, чем в контроле (т.е. протекания модельного перитонита без лечения). Достаточно высокая активность наблюдается у триазолбетаина и антибиотиков ампицил-

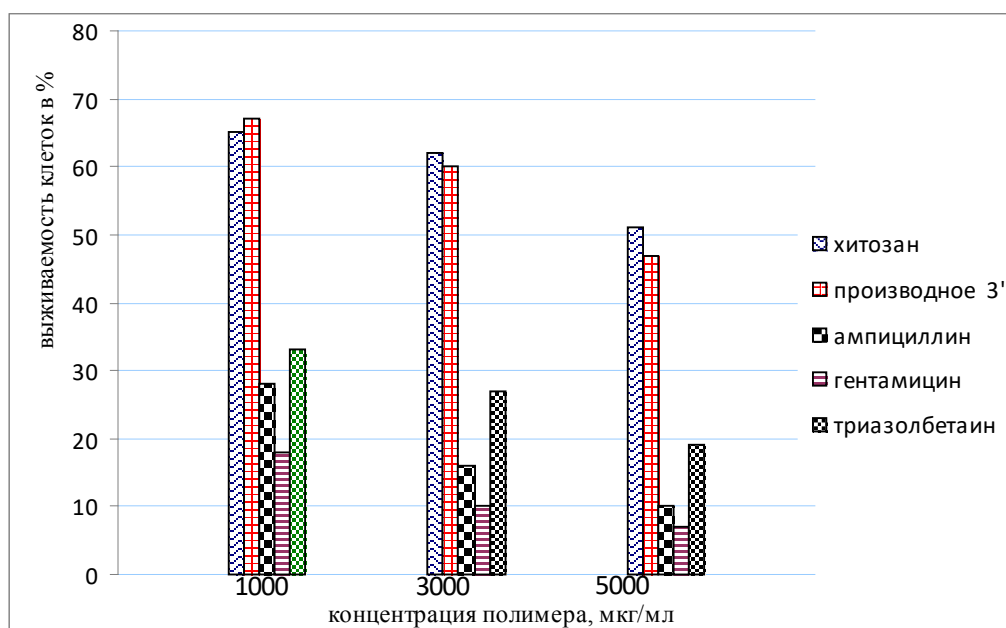


Рисунок 2. – Зависимость выживаемости клеток микроорганизмов при инкубировании с образцами хитозана и тетразолбетаинового производного **3'** в различных концентрациях в течение 4 часов

Таблица 2. – Антибактериальная активность *in vivo* производного хитозана **3'** в сравнении с исходным хитозаном, триазолбетаином, ампициллином и гентамицином

Образец	КОЕ/мл экссудата (через 7 ч после введения раствора или через 31 ч после заражения)
Контроль без лечения через 24 ч после заражения	2546 ± 288
Хитозан	1886 ± 402
Производное 3'	нет роста
Ампициллин	538 ± 183
Гентамицин	337 ± 91
Триазолбетаин	604 ± 108

лина и гентамицина. Антибактериальная активность этих соединений сопоставима, однако ниже активности производного **3'**. Соединение **3'** обладает высокой антибактериальной активностью *in vivo* – роста колоний после отбора экссудата выявлено не было. Высокая активность производного хитозана, несомненно, обусловлена наличием фармакофора в полимерной матрице. Более низкая эффективность ампициллина, гентамицина либо триазолбетаина, несомненно, связана с быстрой элиминацией препаратов при внутриполостном введении. Элиминация полимеров происходит значительно медленнее, что приводит к возрастанию антибактериальной активности высокозамещенного производного **3'** по сравнению с триазолбетаином и антибиотиками ампициллином и гентамицином.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Триазолбетаиновые производные хитозана обладают выраженной антимикробной активностью в отношении *S. aureus* и *E. coli*, превышающей активность исходного хитозана. Активность высокозамещенных производных *in vitro* превышает антимикробную эффективность антибиотиков ампициллина и гентамицина.

2. Высокозамещенное триазолбетаиновое **3'** производное обладает высокой антибактериальной активностью *in vivo*, превышающей активность антибиотиков ампициллина и гентамицина.

3. Конъюгирование триазолбетаина с хитозаном значительно повышает антибактериальную активность хитозана и значительно снижает токсичность триазолбетаина.

4. Для изученных производных хитозана характерна низкая токсичность.

SUMMARY

A. S. Kritchenkov, O. V. Volkova,
N. V. Zheleznyak, O. V. Kurliuk,

T. V. Shakolo,

A. P. Dysin, N. A. Lipcan

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TRIAZOLBETAIN CHITOSAN DERIVATIVES

The purpose of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity and *in vivo* toxicity of cation triazolbetaine chitosan derivatives compared to initial chitosan, ampicillin, gentamicin and triazolbetaine. It has been shown that triazolbetaine chitosan derivatives have a pronounced antimicrobial activity *in vitro* concerning *S. aureus* and *E. coli*, exceeding the activity of initial chitosan. The highest activity is characteristic of the highly substituted derivatives and it exceeds antimicrobial efficacy of ampicillin and gentamicin antibiotics. Highly substituted triazolbetaine derivatives possess high antibacterial activity *in vivo* exceeding the activity of ampicillin and gentamicin. The toxicity of the derivatives studied is either extremely low or does not become apparent at all. Thus, the introduction of triazolbetaine into chitosan chain significantly increases antibacterial activity of chitosan and significantly reduces the toxicity of triazolbetaine.

Keywords: polysaccharides, antibacterial activity, cation derivatives, "structure-activity" relationship.

ЛИТЕРАТУРА

1. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective / I. Sultan [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – № 9. – P. 2066.

2. Verlee, A. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives / A. Sultan, S. Mincke, C. V. Stevens // *Carbohydrate Polymers*. – 2017. – № 164. – P. 268–283.

3. Галкина, И. В. Элементоорганические бетаины: уч. пособие / И. В. Галкина [и др.]. – Казань, 2007. – 49 с.

4. Критченков, А. С. «Клик»-реакции

в химии хитозана / А. С. Критченков, А. Р. Егоров, Ю. А. Скорик // *ИзвАН, Сер. Хим.* – 2018. – № 5. – С. 769–781.

5. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. ОФС. 1.2.4.0010.15. – М.: Медицина, 2015. – 1004 с.

6. Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики: приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201608160001>. – Дата доступа: 20.01.2020.

7. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf. – Дата доступа: 08.01.2020.

8. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Н. Миронов, А. А. Емельянова // *Academia.edu*. – 2012. – 725 с.

9. Rahman, A. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Novel Cross-Linked Chitosan Hydrogels / A. Rahman, M. I. Choudhary, W. J. Thompson // *Bioassay Techniques for Drug Development*; Harwood Academic Publishers, Netherlands, 2001. – Vol. 16. – P. 2024–2027.

10. Критченков, А. С. Хитозан и его производные: векторы в генной терапии / А. С. Критченков, Ю. А. Скорик // *ИзвАН, Сер. Хим.* – 2017. – № 67 (10). – С. 769–781.

11. Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen *Burkholderia seminalis* / M. M. Lou [et al.] // *Carbohydr. Res.* – 2011. – V. 346, № 11. – P. 1294–1301.

Адрес для корреспонденции:

210009, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»,
кафедра общей и клинической фармакологии
с курсом ФПК и ПК,
тел. раб.: 8 (0212) 58-13-87,
Шаколо Т. В.

Поступила 24.01.2020 г.